

15-2 がん生物学に基づく新しい治療法の開発に関する研究

主任研究者 国立がんセンター東病院臨床開発センター 江 角 浩 安

研究成果の要旨

栄養飢餓耐性解除を指標として、伝統薬抽出物の中からアクチゲニンとエンジェルマリンの二つを見いだした。アクチゲニンは抗腫瘍性を確認した。GRP75遺伝子のプロモーターを用い、小包体ストレス反応抑制効果を指標として、ビグアナイド系経口糖尿病薬に抗腫瘍性が期待されることが明らかになった。白血病の骨髄残存病変を抗VLA4抗体で抗がん剤に感受性増強できることを明らかにしたが、臨床導入すべくヒト型の抗体を得た。放射線化学療法後残存再発腫瘍を検討すると、低酸素状態と浸潤性が良く相関した。がん細胞の足場非依存的増殖を解除する活性をゲルダナマイシンに認めた。) 大腸がん細胞ではWntシグナルによるGSK3βの制御が変化し、分子標的となることが分かった。腫瘍微小環境とがんの性質を代謝的に解析するため、メタボロミクス解析を始め、腫瘍細胞は特殊なエネルギー代謝をする可能性を見いだした。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
江 角 浩 安	* ¹ 国立がんセンター研究所支所 支所長 * ² 国立がんセンター東病院 臨床開発センター センター長	がん生物学に基づく新しい治療法に関する研究
富 田 章 弘	財団法人癌研究会 癌化学療法 センター ゲノム研究部 部長	固形がん内部環境に対する細胞応答を標的とした治療法の開発
松 永 卓 也	札幌医科大学医学部 内科学第四講座 講師	VLA4 を分子基盤とした急性白血球の微小残存病変にたいするアノイキス誘導療法の開発
深 澤 秀 輔	国立感染症研究所 生物活性物質部 室長	がん細胞に anoikiis 感受性を誘導する分子標的治療薬開発に関する研究
曾 我 朋 義	慶應義塾大学 先端生命科学研究所 助教授	がんメタボローム
塩 崎 均	近畿大学医学部外科 教授	食道癌に対する新たな化学放射線療法を試み —分子生物学的、臨床病理学的見地から—
源 利 成	金沢大学がん研究所 教授	細胞調節システム破綻の解明と大腸がん制御への応用
門 田 重 利	富山大学 和漢医薬学総合研究所 教授	悪性癌の治療に有用な伝統薬物の活性物質に関する研究
藤 林 康 久	福井大学 高エネルギー医学研究 センター 教授	超小型サイクロトロン産生 Cu-64 による内用放射線治療に関する研究

深町 勝己 名古屋市立大学大学院
医学研究科 助手
中川 和彦 近畿大学医学部 助教授
福田 治彦 国立がんセンター研究所
薬効試験部 室長
辻 孝 南和歌山医療センター
放射線科 副院長
新見 伸吾 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 第三室長
桑原 博昭 北海道がんセンター
呼吸器外科 医師

*1：平成17年 4月 1日～平成17年 9月30日

*2：平成17年10月 1日～平成18年 3月31日

Ras トランスジェニックラットを用いた膵がんモデルおよび治療モデルの開発

Survivin を標的にした新しい分子標的治療の確立
がん生物学に基づく新しい治療法の臨床評価の方法論

野生型 p53 細胞株に対するセレンウム化合物の放射線防
禦作用、抗癌剤防禦作用に関する研究

アネキシン A3 を標的とした癌治療に関する基礎的研究

ムチン様膜蛋白 MUCI を介する分子標的治療法の検討

総括研究報告

1 研究目的

本研究ではがん組織特異的生物学的性質を標的とし特異性の高い治療法の開発を一義的目標とする。

1. 放線菌、和漢薬から栄養飢餓耐性、低酸素応答、足場依存性などを標的とした薬剤探索。
2. キガマイシンなどの臨床導入の準備をする。自家発生腫瘍など新しい抗癌療法検討のための動物モデルの作製。
3. 遺伝子発現プロファイルの解析などを用い新しい治療の標的となる分子、生物反応の検索。
4. メタボロミクスの研究手法を用いたヒトがん、動物の腫瘍モデルの特性、および新しい薬物の作用点の解析。
5. 血液系腫瘍の生物学的特徴を利用した治療法の開発。
6. 低酸素部位に集積する放射性核種 Cu64 などを用い選択的放射線治療を探る。
7. 新しい臨床導入モデルを開発する。

2 研究方法

以下の研究方法で進めた。

1. 放線菌、和漢薬から栄養飢餓耐性、低酸素応答、足場依存性などを標的とした薬剤探索を班員が従来より開発してきた独自の方法で行う
2. キガマイシンなどを用い毒性試験をする
3. 自家発生腫瘍など新しい抗癌療法検討のための動物モデルを作成し、ヒトの腫瘍細胞や腫瘍組織の特徴を備えた治療効果評価モデルを確立する
4. 遺伝子発現プロファイルの解析などを用い新しい治療の標的となる分子、生物反応の検索
5. 血液系腫瘍の生物学

的特徴を利用した治療法を、足場依存性など従来と異なる視点で検討する

6. 低酸素部位に集積する放射性核種 Cu64 などを用い選択的放射線治療を探る
7. 遺伝子発現解析を多角的に行い、生物反応のモデル化を治療薬の選択の面から行う
8. 大腸がんにおける GSK3b の新しい制御機構を解明し、そのがん悪性化との関りを明らかにする
9. メタボロミクスで各種の腫瘍系の解析をする

3 研究成果

昨年度と本年度の研究成果を以下に簡潔にまとめて述べる。

1) 放線菌から見いだしたキガマイシンは、抗腫瘍性は示すが分子量が大きく、かつ血管毒性を示した。その誘導体などの検討をしている。

2) 伝統薬物から新たな抗癌性物質を上と同様の方法で分離しその一つはアクチゲニンであると同定した。他の一つは新規物質でエンジェルマリンと名付けた。アクチゲニンはヌードマウスでの PANC-1 細胞腫瘍に腹腔内投与で抗腫瘍性を示した。エンジェルマリンは抗腫瘍性実験を各種のゼノグラフトで検討中である。アクチゲニンは、キガマイシンなどと同様にグルコース飢餓、アミノ酸飢餓による AKT のリン酸化を阻害した。PI3 キナーゼの阻害活性があった。エンジェルマリンは培地に添加後約一時間の間は各種の刺激による AKT の活性化を促進したが、2時間目ぐらいからは、アミノ酸やグルコースの欠乏による AKT のリン酸化は抑制した。どのようなメカニズムでこのような現象が起こるのか検討中である。

3) ヒト変異型 H-ras 遺伝子を導入した、コンディショナルトランスジェニックラットで、Cre リコンビナーゼまたは GFP を組み込んだアデノウイ

ルス (AdeX/Cre) を、経胆道的に総胆管から膵管内に注入し、ヒト変異型 ras 遺伝子を膵臓の組織構成細胞を標的として発現させた。注入 5 日の Cre リコンビナーゼ/GFP の発現は主として膵管 (pancreatic duct)、腺房と膵管との間の介在管 (intercalated ducts)、腺房中心細胞 (centro-acinar cells) および少数の腺房細胞 (acinar cells) に確認された。5 週で膵管上皮の異型過形成、介在管上皮の過形成と介在管の増殖、腺房中心細胞の異型増殖が観察された。9 週ではそれぞれから中分化型膵管腺がんの発生がみられ、膵がん特有な desmoplastic 腺がんも見られた。一方、腺房細胞には増殖像はなかった。発生したがんは管状、乳頭状腺がんであり Cytokeratin19 および Cytokeratin7 陽性を示したことから、膵腺がんは膵管上皮、介在管細胞および腺房中心細胞に由来することが示された。班員同士の共同研究として、PET を用いた評価や、メタボロミクス解析などを行っている。4) 腫瘍の小胞体ストレス反応を標的として GRP78 の発現を特徴とする unfolded protein response は、腫瘍細胞の低酸素や低栄養状態での生存戦略として使われている可能性と、薬剤耐性に関与している可能性を明らかにしてきたが、この反応を阻害する物質を検索する方法を開発した。今年度、糖尿病薬として使用されている biguanide 系化合物の Metformin、Buformin、Phenformin が、ヴァーシペロスタチンと同様にグルコース飢餓環境選択的細胞毒性を示すことを見出した。またグルコース飢餓下で UPR レポーター活性を抑制すること、分子シャペロン GRP78 の発現を抑制することが明らかになった。5) 急性骨髄性白血病の骨髄残存病変への抗がん剤の感受性を高めることは、治癒率の上昇にとって重要である。骨髄残存病変は、ファイブロンectin への VLA4 による結合に強い相関があることを見つけてきた。そこで、抗 VLA4 抗体を治療に使うべく、抗ヒト VLA4 キメラ抗体の開発をした。ヒト化キメラ抗 VLA4 抗体を添加することで、U937 AML 細胞株および患者白血病細胞の AraC に対する感受性が増強することが明らかとなった。6) は食道扁平上皮癌放射線化学療法遺残腫瘍という、ある意味特殊な、難治性の癌の性格を明らかにし、これに対する分子標的はどこにあるのかを検討した。食道癌放射線化学療法後遺残腫瘍は、低酸素状態に抵抗性を示し、増殖性は乏しいが浸潤性を得ることにより広範な進展を示していた。低酸素耐性に対する治療、浸潤抑制などが有効な治療標的になると考えられ、そのような薬剤の開発が今後期待される。7) がん細胞の足場非依存的増殖を標的とした治療法の開発を試み、Hsp90 阻害剤で

ある 17-Allyl-geldanamycin (17-AAG) 17-N, N-dimethylaminoethylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17-DMAG) が、大腸がん細胞株 DLD1、HT29 に anoikis 感受性を誘導した。このとき BimEL の増加は観察されず、Hsp90 阻害剤は MEK 阻害剤とは異なる機序で anoikis 感受性を誘導することが示唆された。8) 銅錯体、Cu-ATSM は腫瘍の低酸素領域に特異的に集積する。マウスに LLC 細胞を皮下移植して結節腫瘍を形成させた。Cu-64-ATSM を静脈投与し約 1 時間後に腫瘍を無菌下に摘出し切片を作成した。イメージングプレートを用いて放射能分布を調べ、Cu-ATSM 集積の異なる 3 箇所から細胞を切り出した。トリプシンおよびコラゲナーゼ処理により細胞を遊離させ、生細胞数をそろえた後、プレート上で培養しコロニー形成能を評価した。その結果、Cu-ATSM が高度に集積した部位すなわち増殖を停止している細胞群のほうが、集積の低い部位よりもコロニー形成能に優れることが明らかとなった。したがって、Cu-ATSM 高集積部位にある細胞は、その状況では増殖を自発的に停止しているものの、環境を整えば他の部位よりも活発に増殖する能力を備えていると考えられる。9) 大腸がん細胞では、APC 遺伝子の突然変異や β -catenin の変異によりこのシグナル系が活性化されている。本年度は GSK3 β が癌細胞の生存・増殖を維持・促進するというこれまでに知られていなかった新しい機能を初めて明らかにすることによって、本酵素が大腸がんの新しい治療標的であることを示した。10) 腫瘍微小環境とがんの性質を代謝的に解析するため、メタボロミクス解析を始め、腫瘍細胞は栄養飢餓状態で嫌気的アミノ酸代謝をする可能性を見いだした。11) 新しい分子標的薬の臨床試験に監視検討した。今後注目されるのは、「対象を絞り込んで」でも「SUPERSTAR」を求める治療開発戦略であり、ある新薬が「効く」対象と「効かない」対象を選別しながら治療開発を進めていく戦略、すなわち「バイオマーカーの探索」をより適切に組み込んだ治療開発戦略が必要であると考えられた。

4 倫理面への配慮

本研究では、臨床材料の遺伝子発現解析などが含まれるため、各研究施設において倫理審査委員会の承認を得て行った。動物実験においては、動物実験の倫理指針に従う。今後は、臨床試験を目指すため、プロトコルを各施設の倫理審査委員会に提出する予定である。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Lu J., Esumi H., et al. Chemopreventive effect of peroxisome proliferators activated receptor gamma on gastric carcinogenesis in mice. *Cancer Res.* 65(11):4769-4774, 2005.
2. Suzuki A., Esumi H., et al. Involvement of transforming growth factor- β 1 signaling in hypoxia-induced tolerance to glucose starvation. *J Biol Chem.* 280(36):31557-31563, 2005.
3. Awale S., Kadota S., Esumi H., et al. Angelmarin, a novel anti-cancer agent able to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Bioorg Med Chem Lett.* 16(3):581-3, 2006.
4. Kishimoto A., Esumi H., et al. A pull-down assay for 5' AMP-activated protein kinase activity using the GST fused protein. *Molecular Biotechnol.* 32(1):17-22, 2005.
5. Awale S., Kadota S., Esumi H., et al. Identification of arctigenin as an anti-tumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer Res.* 66(3):1751-1757, 2006.
6. Morito N., Esumi H., et al Overexpression of c-Maf Contributes to T-Cell Lymphoma in Both Mice and Human. *Cancer Res.* 66(2):812-819, 2006.
7. Fisher JS, Esumi H., et al. Muscle contractions, AICAR, and insulin cause phosphorylation of an AMPK-related kinase. *Am J. Physiol.*, in press.
8. Suzuki A, Esumi H., et al. Ndr2 acts as the upstream kinase of ARK5 during IGF-1 signaling. *J Biol Chem.*, in press.
9. Masumi, A., Fukazawa H., et al. Reduction of Hepatitis C virus NS5A phosphorylation through its interaction with amphiphysin II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336:572-578, 2005.
10. Masumi, A., Fukazawa H., et al. Nucleolin is involved in Interferon Regulatory Factor-2 dependent transcriptional activation. *Oncogene*, in press.
11. Jaros, M., Soga, T., Van de Goor, T., Gas, B. Conductivity Detection in Capillary Zone Electrophoresis - Inspection by Peak Master, *Electrophoresis* 26, 1948-1953, 2005.
12. Sugimoto, M., Kikuchi, S., Arita, M., Soga, T., Nishioka, T., Large-Scale Prediction of Cationic Metabolites Identity and Migration Time in Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry using Artificial Neural, 2005.
13. Ishii, N., Soga, T., Nishioka, T., Tomita, M., Metabolome Analysis and Metabolic Simulation, *Metabolomics* 1, 29-37, 2005.
14. Shiozaki H., Doki Y., et al. Reduced tumor vessel density and high expression of glucose transporter 1 suggest tumor hypoxia of squamous cell carcinoma of the esophagus surviving after radiotherapy. *Surgery.* 137:536-44, 2005.
15. Shakoori, A., et al, Minamoto, T. Deregulated GSK3 β activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 334: 1365-1373, 2005.
16. Fuchs, S. Y., et al, Minamoto, T. Oncogenic β -catenin signaling networks in colorectal cancer. *Cell Cycle*, 4: 1522-1539, 2005.
17. Maenaka, S., Minamoto, T., et al. Loss of imprinting in IGF2 in colorectal carcinoma assessed by microdissection. *Oncol. Rep.*, in press.
18. Obata A., Fujibayashi Y., et al. Basic characterization of Cu-64-ATSM as a radiotherapy agent. *Nucl Med Biol*, 32(1): 21-28, 2005.
19. Fukamachi, K., Tsuda, H., et al., Possible Enhancing effects of atrazine and nonylphenol on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumor development in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats, *Cancer Sci.*, 95: 404-410, 2005.
20. Tsuda H., Fukamachi K., et al., High susceptibility of human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats to carcinogenesis: a cancer-prone animal model. *Cancer Sci.*, 96: 309-316, 2005.
21. Yamamoto N., Nakagawa, K., et al., EGFR mutation in gefitinib-responsive small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, in press.
22. Niimi, S., et al., Expression of annexin A3 in primary cultured parenchymal rat hepatocytes and inhibition of DNA synthesis by suppression of annexin A3 expression using RNA interference. *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 424-428, 2005.
23. Niimi, S., et al., Thrombomodulin enhances the invasive activity of mouse mammary tumor cells. *J. Biochem.*, 137, 579-586, 2005.